亮叶中南鱼藤的杀虫活性及有效成分

李有志[1,2],徐汉虹[1,*],魏孝义[3],马　骏[2]

(1. 华南农业大学,农药与化学生物学教育部重点实验室/昆虫毒理研究室,广州　510642;
2. 湖南农业大学生物安全科技学院,长沙　410128;3. 中国科学院华南植物园,广州　510650)

摘要:研究了亮叶中南鱼藤 *Derris fordii* var. *lucida* 的杀虫活性及有效成分。通过生物测定确定了该植物提取物对几种害虫的杀虫活性及其作用方式,并在活性跟踪的基础上,通过萃取、柱层析、薄层制备、重结晶、核磁共振和质谱等方法对其有效成分进行了分离和鉴定。结果表明,亮叶中南鱼藤不同部位甲醇提取物中仅根部提取物表现出杀虫活性。根甲醇提取物对白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 4 龄幼虫、棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 无翅成蚜、豆蚜 *Aphis craccivora* Koch 无翅成蚜、桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)无翅成蚜、甘薯天蛾 *Herse convolvuli* L. 2 龄幼虫、三化螟 *Scirpophaga incertulas* (Walker)初孵幼虫、菜青虫 *Pieris rapae* (L.) 2 龄幼虫和黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* (Fabricius)成虫都有毒杀效果,其 LC_{50} 值分别是260.3 mg/L、234.6 mg/L、141.3 mg/L、16.4 mg/L、233.4 mg/L、20.8 mg/L、11.7 mg/L 和 148.4 mg/L。根甲醇提取物对甘薯天蛾 3 龄幼虫 24 h 的触杀和胃毒毒力 LC_{50} 值分别为 101.6 mg/L 和 234.9 mg/L。此外,亚致死剂量的根甲醇提取物对甘薯天蛾 3 龄幼虫还有拒食和抑制生长发育的作用。从根中分离和鉴定了 3 个化合物,即鱼藤酮、6a,12a-脱氢鱼藤素和 β-谷甾醇。鱼藤酮和 6a,12a-脱氢鱼藤素对三化螟初孵幼虫表现出毒杀活性,24 h 的 LC_{50} 值分别是 2.6 mg/L 和 5.3 mg/L。结论为 亮叶中南鱼藤仅根为活性部位,该甲醇提取物对棉蚜等多种害虫有活性,其主要作用方式为触杀和胃毒,鱼藤酮和 6a,12a-脱氢鱼藤素是根中的主要杀虫活性成分。

关键词:亮叶中南鱼藤;杀虫活性;有效成分;鱼藤酮;6a,12a-脱氢鱼藤素

中图分类号:Q965.8　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0454-6296(2007)07-0695-08

Insecticidal activities and active ingredients of *Derris fordii* var. *lucida*

LI You-Zhi[1,2], XU Han-Hong[1,*], WEI Xiao-Yi[3], MA Jun[2] (1. The Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Insecticidal activities and active ingredients of *Derris fordii* var. *lucida* were studied for the first time. Insecticidal activities and action mode were determined by bioassay. The active ingredients were isolated from the roots by activity-directed fractionation with column chromatography, thin layer chromatography (TLC) and recrystallization, and identified predominantly on the basis of MS and NMR data. The results showed among methanol extracts from various parts of *D. fordii* var. *lucida* only that from the roots had insecticidal activity. The methanol extract from the roots of *D. fordii* var. *lucida* had toxicity against the 4th instar larva of *Aedes albopictus*, *Aphis gossypii* Glover, *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, the 2nd instar larva of *Herse convolvuli* (L.), the neonate larva of *Scirpophaga incertulas* (Walker), the 2nd instar larva of *Pieris rapae* (L.) and the adult of *Phyllotreta striolata* (Fabricius), with LC_{50} value 24 h after treatment being 260.3 mg/L, 234.6 mg/L, 141.3 mg/L, 16.4 mg/L, 233.4 mg/L, 20.8 mg/L, 11.7 mg/L and 148.4 mg/L, respectively. The methanol extract from the roots had high contact toxicity and stomach toxicity to the 3rd instar larva of *H. convolvuli* at 24 h after treatment, with the values being 101.6 mg/L and 234.9 mg/L,

基金项目:国家自然科学基金项目(30471172,30571235)

作者简介:李有志,男,1970 年生,湖南常德人,博士研究生,主要从事昆虫毒理学研究,E-mail:liyouzhi2008@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.:020-85280304;E-mail:hhxu@scau.edu.cn

收稿日期 Received:2006-11-06;接受日期 Accepted:2007-03-19

respectively. Moreover, the sublethal dosage of the extract had sublethal effect of antifeeding and growth inhibition. Three compounds were isolated from the roots and identified: rotenone, β-sitosterol and 6a,12a-dehydrodegulin. The two compounds, rotenone and 6a,12a-dehydrodeguelin, possessed poison effect on the neonate larva of *S. incertulas*, with the LC_{50} value at 24 h after treatment being 2.6 mg/L and 5.3 mg/L, respectively. It is so concluded that only the roots of *D. fordii* var. *lucida* had insecticidal activities, contact toxicity and stomach toxicity were the important action mode, and rotenone and 6a,12a-dehydrodeguelin were the main active ingredients in the roots.

Key words: *Derris fordii* var. *lucida*; insecticidal activity; active ingredient; rotenone; 6a, 12a-dehydrodeguelin

在长期的生存进化中,植物为了自身的生存、发展和各种环境的适应,形成了种种次生代谢途径,产生多种多样的代谢产物,用来抵制昆虫和其他草食动物的取食,提高其生存竞争能力。从植物中寻找有杀虫活性的次生代谢产物和先导化合物,开发创新农药,是世界各国农药科学研究工作者公认的有效途径之一。此外,长期以来,使用化学药剂杀虫一直是控制害虫的重要手段之一,但是随着人类对食品安全、环境保护和有害生物抗性问题的日益重视,化学杀虫剂的使用正受到越来越严格的限制,许多杀虫剂已被禁用,这为开发和利用植物中有活性的次生代谢产物作为杀虫剂带来机遇。因此,研究和开发植物源杀虫剂,对于防治害虫、控制农药残留、确保食品安全和提高农产品竞争力都具有重要意义。

鱼藤属植物盛产于热带和亚热带,在我国广东、福建、云南和台湾等省有广泛的分布,常见种有毛鱼藤 *D. elliptica*、马来鱼藤 *D. malaccensis* 和锈色鱼藤 *D. ferruginea* 等。从这些植物中先后分离出多种有杀虫活性的化合物(徐汉虹,2001),其中鱼藤酮制剂已被广泛应用于农业生产。中南鱼藤 *Derris fordii* 属豆科鱼藤属多年生木质藤本植物,主要分布于湖南、贵州、江西、浙江、广西、广东、湖北等省(喻勋林和薛生国,1999;肖双燕等,2002;陈芳清等,2003;徐汉虹等,2003;李先源等,2004;史红文等,2005)。亮叶中南鱼藤 *D. fordii* var. *lucida* 是中南鱼藤的变种,分布于湖南江永、道县及贵州的望漠和兴义,为石灰岩特有植物(喻勋林和肖育檀,1999;张天伦等,2005)。作者在前期的杀虫植物活性筛选中发现亮叶中南鱼藤有较高的杀虫活性,特别是对呋喃丹和敌杀死等农药抗性水平较高的棉蚜有较好的毒杀效果,因此,对其活性成分的研究,将有助于该植物的合理利用。但至今未见中南鱼藤和亮叶中南鱼藤杀虫作用的报道。本研究试图通过系统地研究亮叶中南鱼藤的杀虫活性,确定活性成分存在的部位,明确其作用方式,分离并鉴定其主要的活性成分,为该植物的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫:室内连续多代饲养白纹伊蚊 *Aedes albopictus*、甘薯天蛾 *Herse convolvuli* (L.)、桃蚜 *Myzus persicae* Sulzer 无翅成蚜、棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 无翅成蚜和豆蚜 *Aphis craccivora* Koch 无翅成蚜供试验用。棉蚜虫源来自湖南省华容县棉区;从长沙市郊区采集甘薯天蛾幼虫;其余虫源来自广州地区。白纹伊蚊幼虫饲料为医用酵母片,成虫吸取小白鼠的血。甘薯天蛾幼虫饲料为盆栽甘薯苗。菜青虫和桃蚜饲料为甘蓝苗。棉蚜和豆蚜的饲料分别是棉苗和豆苗。将从广东省清远市采集的三化螟 *Scirpophaga incertulas* (Walker)卵块置于室内的培养皿内,用湿纱布保湿。孵化 2~3 h 的初孵幼虫供试验用;从长沙市郊区菜地采集菜青虫 *Pieris rapae* (L.)卵,待卵在室内孵化后继续饲养,然后挑选健康适龄幼虫供试验用;从广州郊区没有施药的菜地采集黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* (Fabricius)成虫供试验用。

1.1.2 植物材料:采集地点为湖南省江永县;采集时间为 2003 年 5 月;植物标本(标本编号 20030509)保存于湖南农业大学植物标本室;由华南农业大学李秉滔教授鉴定。

1.1.3 主要仪器和试剂:DRX-400 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司生产);RY-1G 熔点仪(天津市新天光仪器公司生产);MAT-711 型质谱仪(美国 Thermo 公司生产);KH-500 型超声波清洁器(昆山禾创超声仪器有限公司);硅胶(青岛海洋化工厂分厂生产);凝胶 Sephadex LH-20(Amersham 公司提供)。

1.2 活性成分提取、分离和鉴定方法

1.2.1 植物材料的提取：将亮叶中南鱼藤的叶、茎(藤)、根、根皮及剥皮后的根置于通风处阴干，再在60℃的恒温鼓风干燥箱内干燥，然后用植物粉碎机粉碎，过 40 目(孔径为 635 μm)筛。将一定量的植物材料干粉放入玻璃容器中，加入干粉重 5 倍量的甲醇，在室温下浸提 72 h，过滤。共浸提 3 次，将 3 次滤液合并，在 55℃减压浓缩得植物提取物浸膏，称重，保存于冰箱中备用。根据植物材料质量和提取物质量计算各部位提取物的提取率。

1.2.2 根部提取物的初步分离：将根甲醇提取物用少量甲醇溶解，再加 5 倍量水热溶后装入分液漏斗内，依次用石油醚、氯仿和乙酸乙酯萃取。每种溶剂连续萃取 3 次(500 mL/次)。最后分别将石油醚层萃取液、氯仿层萃取液、乙酸乙酯层萃取液以及最后所剩水层溶液减压浓缩至稠膏并称重。

1.2.3 成分分离和结构鉴定：分离过程中根据白纹伊蚊 4 龄幼虫的生物测定结果来跟踪活性。然后在活性跟踪的基础上，通过柱层析、薄层制备(TLC)、重结晶、测定化合物的熔点、核磁共振和质谱方法分离和鉴定化合物结构。具体是首先将根的氯仿萃取物通过硅胶柱层析，选取适当的洗脱系统进行分离，通过点板(TLC)后合并相同的流分。然后对合并后有活性的流分再次进行硅胶柱层析或凝胶柱层析或重结晶等方法纯化。得到纯化合物(经点板确认)后测定化合物的熔点、并通过核磁共振波谱仪和质谱仪得到^{1}H NER、^{13}C NMR 和质谱图。最后解析图谱得到相关数据后综合各种信息确认化合物的结构。

1.3 杀虫活性测定方法

1.3.1 亮叶中南鱼藤不同部位甲醇提取物对试虫的毒杀活性测定：药液现配现用，配制药液的具体方法是分别将叶、茎(藤)、根、根皮及剥皮后的根等部位甲醇提取物 0.1 g 溶于 3 mL 丙酮中，以水定容到 10 mL 作为母液。将 1 mL 母液转移至 20 mL 瓶中，然后以水定容至 20 mL 得 20 mL 不同部位甲醇提取物药液，药液浓度为 500 mg/L；对照为 3 mL 丙酮以水定容到 10 mL，将 1 mL 丙酮溶液转移至 20 mL 瓶中，然后以水定容至 20 mL。试验中配制提取物药液时，用超声波处理 5 min 增强其溶解性。采用浸渍法(蒋妮等，2006)测定各部位粗提物对棉蚜无翅成蚜、三化螟初孵幼虫和甘薯天蛾 2 龄幼虫的毒杀活性，即将饲料(甘薯叶片、棉苗和水稻苗)浸入药液 5 s 后迅速取出、晾干后放入垫有湿润滤纸的养虫缸中，接入已饥饿约 3 h 的试虫，试验中及时添加经过相同处理的饲料叶片。各药剂对白纹伊蚊幼虫的毒杀活性测定是在 20 mL 药液中直接放入发育一致的该 4 龄幼虫。每处理 30 头虫，重复 3 次，处理 48 h 后统计结果。试验中用软毛笔小心转移试虫。养虫室室温(26 ± 1)℃。

1.3.2 根提取物和化合物杀虫活性的毒力测定：先用少量丙酮(或 DMSO)将甲醇提取物或分离的纯化合物溶解，再用水配成 5 个所需浓度的药液，设溶剂空白对照。试虫是 4 龄白纹伊蚊幼虫、蚜虫(棉蚜、桃蚜和豆蚜)无翅成蚜、甘薯天蛾 2 龄幼虫、三化螟初孵幼虫、2 龄菜青虫和黄曲条跳甲成虫。药后 24 h 统计结果。其余同 1.3.1。

1.3.3 根甲醇提取物对甘薯天蛾 3 龄幼虫的胃毒、触杀毒力和生长发育的影响：触杀作用测定方法是用微量点滴仪点滴药液于试虫前胸背板，1 μL/头。药液配制同 1.3.2。处理 24 h 后调查结果。

胃毒作用的测定采用叶碟法，叶碟直径 1 cm。用配制好的药液浸渍叶碟 5 s，待溶剂挥发净后，将叶碟放入垫有湿润滤纸的培养皿中。每皿放入 4 片叶碟和 1 头已饥饿 4 h 的甘薯天蛾 3 龄幼虫。每处理重复 45 次，空白对照用丙酮代替药液。处理 24 h 后调查结果。

生长发育抑制作用的测定采用叶片浸渍法(蒋妮等，2006)，药液浓度为亚致死剂量 80 mg/L，单头饲养，共 45 头。分别在处理前和处理 24 h、48 h 和 60 h 称量幼虫体重，然后计算抑制率。所有试验数据均用 DPS(唐启义和冯明光，1997)软件处理。

1.3.4 活性跟踪方法：对柱层析中各流分的活性跟踪以白纹伊蚊 4 龄幼虫为试虫；根提取物经萃取后，对不同溶剂萃取物的活性测定中，试虫为白纹伊蚊 4 龄幼虫、三化螟初孵幼虫、黄曲条跳甲成虫和棉蚜无翅成蚜。处理 24 h 后统计结果。其余同 1.3.1。

2 结果与分析

2.1 亮叶中南鱼藤不同部位甲醇提取物的杀虫活性和提取率

亮叶中南鱼藤不同部位甲醇提取物的杀虫活性见表 1。在提取物浓度为 500 mg/L 时，根、根皮和根木质部的甲醇提取物都有杀虫活性，叶和茎(藤)的提取物没有表现出杀虫活性。根皮提取物对 4 种害虫的活性均显著高于根木质部甲醇提取物的活性。

可见，叶和茎（藤）没有杀虫活性，根中活性成分主要集中于根皮部分。从表 1 还可知，各部位的提取率相差较大，其中根皮和叶片的提取率显著高于其他部位。由于叶片提取物没有活性，提取率高没有什么实际意义，但根皮活性高、杀虫谱广、提取率又高，这可能表明根皮中可被利用的物质也多。

表 1　亮叶中南鱼藤酮各部位甲醇提取物处理 48 h 后的杀虫活性

Table 1　Insecticidal activities of methanol extracts from different parts of *Derris fordii* var. *lucida* at 48 h after treatment

部位 Parts of plant	提取率（%） Extracted rate	校正死亡率 Corrected mortality（%）			
		白纹伊蚊 4 龄幼虫 4th instar larva of *A. albopictus*	棉蚜 *A. gossypii*	甘薯天蛾 2 龄幼虫 2nd instar larva of *H. convolvuli*	三化螟初孵幼虫 Neonate larva of *S. incertulas*
根 Root	11.3 b	100 ± 0 a	84.3 ± 1.7 a	83.3 ± 0.2 a	100 ± 0 a
根皮 Root bark	13.8 a	100 ± 0 a	86.0 ± 0.8 a	89.7 ± 0.1 a	100 ± 0 a
叶 Leaf	13.9 a	0 c	0 c	0 c	0 b
茎 Stem	8.7 c	0 c	0 c	0 c	0 b
根木质部 Xylem of root	3.6 d	11.7 ± 2.3 b	3.2 ± 0.2 b	4.1 ± 0.3 b	0 b

注：表中死亡率为平均值 ± 标准误；同列数据后字母相同者表示在 5% 水平差异不显著（DMRT）；表 4 和表 5 同。

Note: The corrected mortality in the table is mean ± *SE* and those in the same column followed by the same letter are not significantly different at 0.05 level (DMRT). The same for Table 4 and 5.

2.2　亮叶中南鱼藤根甲醇提取物的杀虫活性

2.2.1　根的甲醇提取物对不同害虫的毒力：从表 2 可知，根的甲醇提取物对白纹伊蚊 4 龄幼虫等 8 种害虫都有活性，但毒力相差较大。根甲醇提取物对 2 龄菜青虫的毒力最高，LC_{50} 值为 11.7 mg/L，其次是桃蚜，LC_{50} 值为 16.4 mg/L，对白纹伊蚊 4 龄幼虫的毒力最小，LC_{50} 值为 260.3 mg/L，前者的毒力是后者的 22.2 倍。根甲醇提取物对 4 龄白纹伊蚊幼虫、棉蚜、豆蚜、甘薯天蛾 2 龄幼虫和黄曲条跳甲成虫的毒力处于同一数量级；对 3 种蚜虫而言，对桃蚜的毒力最高，相对毒力比值是 15.8（桃蚜）> 1.8（豆蚜）> 1.1（棉蚜）。可见，亮叶中南鱼藤根甲醇提取物对多种害虫有较高的活性，杀虫谱较广。由于试验中所有试虫均接触和取食了药液，如白纹伊蚊幼虫生活在药液中，菜青虫等在养虫缸中取食和爬行时会接触有提取物的叶片，所以药液对试虫的作用方式可能是触杀、胃毒和熏蒸等多种方式综合作用的结果。

2.2.2　根甲醇提取物对害虫的作用方式：从表 3 可知，亮叶中南鱼藤根的甲醇提取物对 3 龄甘薯天蛾幼虫的作用方式有触杀和胃毒作用，且触杀毒力高于胃毒毒力。用药液浓度为 80 mg/L 的饲料饲喂甘薯天蛾 3 龄幼虫，处理 24 h 和 60 h 后对试虫体重的抑制率分别为 23.6% 和 36.2%。可见，根的甲醇提取物对甘薯天蛾幼虫有多种作用方式，高剂量可通过触杀和胃毒作用直接杀虫，低剂量对幼虫的生长发育有抑制作用。高剂量能杀虫说明根内含有杀虫成分，然而低剂量提取物对昆虫的生长发育有抑制作用却不能表明根内含有抑制生长发育的成分。因为这很可能是低剂量的提取物使昆虫中毒后取食量减少，然后虫体营养条件恶化，结果导致生长发育变慢、体重减轻。

表 2　亮叶中南鱼藤根甲醇提取物对 8 种害虫的 24 h 毒力

Table 2　The 24-h toxicity of the methanol extract from the roots of *Derris fordii* var. *lucida* to eight insect pests

试虫 Insect	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC_{50}（mg/L）（95% 置信限） LC_{50}（95% CI）	卡方值 χ^2	相对毒力 Relative toxicity
白纹伊蚊 4 龄幼虫 4th instar larva of *A. albopictus*	$y = 1.688 + (1.371 \pm 0.232)x$	260.3（183.4 – 356.8）	2.3832	1
棉蚜 *A. gossypii*	$y = 1.315 + (1.554 \pm 0.238)x$	234.6（174.1 – 312.3）	0.3710	1.1
豆蚜 *A. craccivora*	$y = 2.135 + (1.333 \pm 0.232)x$	141.3（93.7 – 194.6）	0.0037	1.8
桃蚜 *M. persicae*	$y = 2.979 + (1.663 \pm 0.248)x$	16.4（11.6 – 21.4）	0.7934	15.8
甘薯天蛾 2 龄幼虫 2nd instar larva of *H. convolvul*	$y = 0.721 + (1.807 \pm 0.295)x$	233.4（159.4 – 311.5）	0.3329	1.1
三化螟初孵幼虫 Neonate larva of *S. incertulas*	$y = 3.033 + (1.492 \pm 0.276)x$	20.8（13.3 – 29.1）	0.2529	12.5
2 龄菜青虫 2nd instar larva of *P. rapae*	$y = 3.413 + (1.523 \pm 0.285)x$	11.7（6.2 – 16.6）	0.5492	22.2
黄曲条跳甲成虫 Adult of *P. striolata*	$y = 1.103 + (1.795 \pm 0.223)x$	148.4（118.2 – 186.2）	4.6439	1.7

表 3　亮叶中南鱼藤根甲醇提取物对甘薯天蛾 3 龄幼虫的毒力

Table 3　Toxicity of methanol extracts from the roots of *Derris fordii* var. *lucida* to the 3rd instar larvae of *Herse convolvuli*

作用方式 Action mode	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC_{50} (mg/L) (95%置信限) LC_{50} (95% CI)	卡方值 χ^2	相对毒力 Relative toxicity
触杀 Contact toxicity	$y = 2.139 + (1.425 \pm 0.272)x$	101.6 (63.1 – 144.1)	0.2564	2.3
胃毒 Stomach toxicity	$y = 1.470 + (1.488 \pm 0.273)x$	234.9 (156.1 – 328.6)	0.1772	1

2.3　亮叶中南鱼藤根的甲醇提取物经萃取后各萃取层的杀虫活性

经确定亮叶中南鱼藤根为活性部位后，为了进一步从根中分离活性成分，通过萃取，将根的甲醇提取物初步分为石油醚层萃取物、氯仿层萃取物、乙酸乙酯层萃取物和水层萃取物。经测定，在萃取物浓度为 500 mg/L 时，水层萃取物对白纹伊蚊幼虫、三化螟幼虫和桃蚜无翅成蚜均无活性，其余三层萃取物有活性，且氯仿层萃取物活性最高，试虫死亡率 100%，石油醚层萃取物和乙酸乙酯层萃取物的活性较低(表 4)。可见，根甲醇提取物经萃取后，杀虫成分主要集中于氯仿层。

表 4　亮叶中南鱼藤各萃取层萃取物处理 48 h 后的杀虫活性

Table 4　Insecticidal activities of different extracts from the roots of *Derris fordii* var. *lucida* at 48 h after treatment

萃取层 Extract	校正死亡率 Corrected mortality (%)			
	白纹伊蚊 4 龄幼虫 4th larva of *A. albopictus*	三化螟初孵幼虫 Neonate larva of *S. incertulas*	黄曲条跳甲成虫 Adult of *P. striolata*	桃蚜 Adult of *A. gossypii*
石油醚层 Petroleum ether extract	7.6 ± 1.1 b	0	0	21.5 ± 3.2 c
氯仿层 Trichloromethane extract	100 ± 0 a	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0 a
乙酸乙酯层 Ethyl acetate extract	22.3 ± 2.4 b	0	0	32.9 ± 1.8 b
水层 Water extract	0 c	0	0	0 d

2.4　亮叶中南鱼藤根有效成分的分离纯化及结构鉴定

2.4.1　有效成分的分离、纯化：

对杀虫活性最高的氯仿层萃取物进行柱层析。氯仿层样品 18 g，用少量氯仿溶解，用 20 g 110 ~ 149 μm 的硅胶拌样，500 g 48 ~ 74 μm 硅胶装柱，以石油醚/乙酸乙酯溶剂梯度洗脱。共有 217 个流分，经点板合并相同流分后得 14 个组分，即 1 ~ 9、10 ~ 23、24 ~ 41、42 ~ 49、50、51 ~ 77、78 ~ 86、87 ~ 96、97 ~ 119、120 ~ 137、138 ~ 165、166 ~ 174、175 ~ 199 和 200 ~ 217。利用白纹伊蚊 4 龄幼虫对各组分进行活性跟踪，结果见表 5。对白纹伊蚊 4 龄幼虫有活性的组分有 42 ~ 49、50、87 ~ 96、97 ~ 119 和 120 ~ 137。可见，经过第 1 次柱层析后，氯仿层萃取物中的活性成分被分为 2 个活性段，即 42 ~ 50 流分和 87 ~ 137 流分。据此可推测氯仿层萃取物中可能含有 2 或 2 个以上的活性成分。

第 50 个流分中溶剂挥发干后，有白色板状晶体析出，该晶体经重结晶得 17.2 mg 纯化合物(化合物 A)。对第 42 ~ 49 个流分再次进行硅胶柱层析，用 3 g 110 ~ 149 μm 的硅胶拌样，50 g 48 ~ 74 μm 硅胶装柱，以石油醚/乙酸乙酯溶剂梯度洗脱得 47 个流分，其中第 13 ~ 17 个流分对白纹伊蚊 4 龄幼虫有活性，将第 13 ~ 17 个流分合并后进行凝胶柱层析(洗脱剂为丙酮)，得 21.2 mg 纯化合物 B 和 9.4 mg 纯化合物 C。第 87 ~ 96 个流分中溶剂挥发干后，有晶体析出，将晶体溶解后经薄层制备得 11.6 mg 纯化合物 D。

表 5　各流分对白纹伊蚊 4 龄幼虫的杀虫活性

Table 5　Insecticidal activities of different fragments of methanol extracts from the roots of *Derris fordii* var. *lucida* against *Aedes albopictus*

流分 Fragments	校正死亡率 Corrected mortality (%) 24 h	48 h
1 ~ 9	0 e	0 e
10 ~ 23	0 e	0 e
24 ~ 41	0 e	0 e
42 ~ 49	100 ± 0 a	100 ± 0 a
50	11.6 ± 1.3 c	23.7 ± 0.9 c
51 ~ 77	0 e	0 e
78 ~ 86	0 e	0 e
87 ~ 96	67.3 ± 1.1 b	86.3 ± 0.9 b
97 ~ 119	15.7 ± 0.3 c	33.7 ± 2.3 c
120 ~ 137	3.6 ± 0.1 d	11.7 ± 0.7 d
138 ~ 165	0 e	0 e
166 ~ 174	0 e	0 e
175 ~ 199	0 e	0 e
200 ~ 217	0 e	0 e

2.4.2　化合物的结构鉴定：

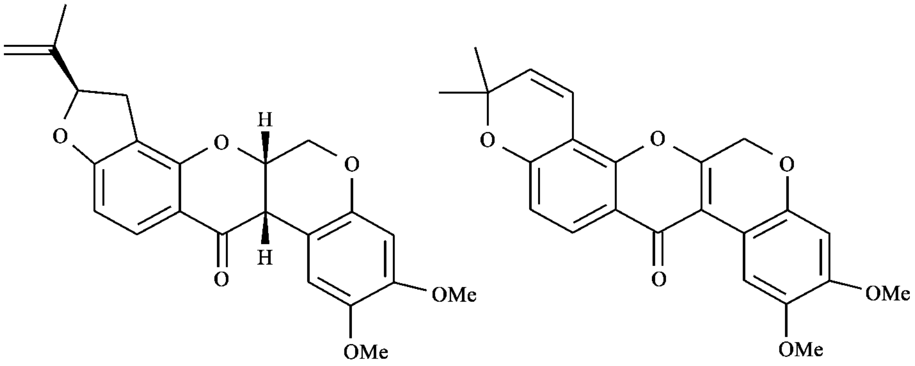
化合物 A 为白色板状

晶体，$[\alpha]_D^{25}$ = −228°（*C* 0.024，苯）。MS（m/z）：394（M^+），192（100），149，191 与鱼藤酮文献值（Ognyanov and Somleva，1980）一致；化合物 A 与鱼藤酮标样混合后，混和物的熔点与标样的熔点（162～164℃）相同；化合物 A 与鱼藤酮标样在多种展开体系中进行薄层层析（TLC）检测，R_f 值相同，且显色和斑点形状相同；化合物 A 核磁共振碳谱数据和氢谱数据与文献（Crombie *et al*.，1975；Abidi and Abidi，1983；Nunlist and Ralph，1988）一致。故确定化合物 A 为鱼藤酮，其结构如图 1（A）。

化合物 B 与 A 为相同化合物鱼藤酮。

化合物 C 为无色针状晶体（氯仿），熔点为 136～137℃。与 β-谷甾醇标准品进行对照，混合后熔点不下降；在多种展开体系中进行薄层层析（TLC）检测，R_f 值一致，且显色和斑点形状相同，故确定化合物 C 为 β-谷甾醇（β-sitosterol）。

化合物 D 为黄色针状晶体，熔点为 231～232℃。MS（m/z）：392（M^+ 100），377，349，345。^1H NMR（400 MHz，$CDCl_3$）：δ_H 1.49（s，6H，7，8-CH_3），3.87（s，3H，3-OCH_3），3.95（s，3H，2-OCH_3），5.03（s，2H，6-CH_2），5.73（d，1H，*J* = 10.00，5-H），6.25（s，1H，4-H），6.76（d，1H，*J* = 10.00，4-H）。化合物 D 的熔点、MS、^1H NMR 与文献（丛蒲珠和李笋玉，2002）一致，故确定化合物 D 为 6a，12a-脱氢鱼藤素（6a，12a-dehydrodeguelin），其结构如图 1（B）。



A B

图 1 亮叶中南鱼藤根中杀虫活性化合物的结构

Fig. 1 Chemical structure of the insecticidal compounds from the roots of *Derris fordii* var. *lucida*

A：鱼藤酮 Rotenone；B：6a，12a-脱氢鱼藤素 6a，12a-dehydrodeguelin.

2.5 3 种化合物的杀虫活性

测定了 3 种化合物对三化螟初孵幼虫的杀虫活性，结果表明，β-谷甾醇无杀虫活性（数据未列出），鱼藤酮和 6a，12a-脱氢鱼藤素有活性（表 6）。鱼藤酮对三化螟初孵幼虫的毒力是 6a，12a-脱氢鱼藤素的 2 倍。

表 6 鱼藤酮和 6a，12a-脱氢鱼藤素对三化螟初孵幼虫 24 h 的毒力

Table 6 Toxicity of rotenone and 6a，12a-dehydrodegulin against the neonate larva of *Scirpophaga incertulas*

活性成分 Active ingredient	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC_{50}（mg/L）（95%置信限） LC_{50}（95% CI）	卡方值 χ^2	相对毒力 Relative toxicity
鱼藤酮 Rotenone	$y = 4.446 + (1.335 \pm 0.266)x$	2.6（1.7－2.8）	0.0582	2.0
6a，12a-脱氢鱼藤素 6a，12a-dehydrodegulin	$y = 4.110 + (1.222 \pm 0.263)x$	5.3（3.1－7.9）	0.0894	1.0

3 结论和讨论

本研究结果表明：亮叶中南鱼藤仅根部有杀虫活性，且对多种害虫有毒杀作用，其作用方式主要是触杀和胃毒。通过活性跟踪，首次从根中分离出了鱼藤酮、6α，12α-脱氢鱼藤素和 β-谷甾醇，其中鱼藤酮和 6α，12α-脱氢鱼藤素为活性成分。

3.1 通过活性跟踪分离活性成分的局限性

通过活性跟踪来分离活性成分，这是分离杀虫植物活性成分时最常用的方法。用此法来分离活性成分的例子很多（邓业成和徐汉虹，2005；周利娟等，2006），但通过活性跟踪来分离也有一定的局限性，一是植物提取物中的微量成分在配制药液时被稀释后浓度会更低，结果由于浓度太低（达不到致死浓度）没有表现出活性而导致微量活性成分被漏筛；

二是植物中活性成分大多是未知的，不同成分杀虫谱不同，如果用一种昆虫跟踪活性，有可能因该种昆虫对某些成分不敏感而导致这些成分漏筛，因此，用何种昆虫跟踪活性事先难以确定。试验中作者用白纹伊蚊幼虫跟踪活性，主要是因为该虫易饲养、发育整齐和较敏感。从表 2 可知，该虫对亮叶中南鱼藤根提取物还不是最敏感的，因此，该植物中很可能还有很多微量的活性成分没有被分离出来。

3.2　亮叶中南鱼藤及其活性成分的应用前景

我国各民族自古以来就有利用植物作为农药的经验和文字记载。烟草、白花除虫菊和鱼藤是杀虫植物中的主要代表，迄今为止仍有重要的应用价值（徐汉虹，2001）。对于亮叶中南鱼藤的利用主要有 3 个方面：(1)直接利用粗提物防治害虫。由于亮叶中南鱼藤根提取物对多种害虫有毒杀作用（表 2），所以可以直接用该植物根的粗提物来防治棉蚜和蔬菜上的菜青虫、蚜虫和黄曲条跳甲等害虫。其中棉蚜是棉花苗期重要害虫之一，由于棉区长期使用呋喃丹、敌杀死等药剂防治该虫，所以棉蚜对这些药剂的抗性水平较高。该提取物中含有多种活性成分，其作用机理不同于棉区常用的呋喃丹和敌杀死，因此，该植物甲醇提取物对棉蚜有较好的毒杀效果，完全可直接用该植物的粗提物防治棉蚜。(2)从该植物根中提取鱼藤酮治虫。由于根中含有鱼藤酮，可直接从粗提物中经重结晶等方法获得鱼藤酮后加工成鱼藤酮制剂防治害虫。(3)对于杀虫植物，除了直接利用外，更重要的是应该侧重于对其高杀虫活性成分的模拟合成研究。因为各种毒素在植物中含量都是很少的，含量高也只是相对而言。无论是技术上，还是工作量或者从生物学角度考虑均不可能不断地大量采收植物，提取大量的活性成分来直接制备商品杀虫剂以满足生产需要。因此，对亮叶中南鱼藤的开发利用，也应与开发其他杀虫植物一样，必须选取其活性高、杀虫谱广、作用方式多样、作用机理与常规杀虫剂不同的主要成分为模板，进行模拟研究。如果在这方面取得突破，能够大量合成，则极有可能开发出一类新型的具有良好环境和谐性的理想杀虫剂。

参 考 文 献（References）

Abidi SL，Abidi MS，1983．^{13}C NMR spectral characterization of epimers of rotenone and some related tetrhydrobenzopyanfurobenzopyanones．*Journal of Heterocyclic Chemistry*，20：1 687－1 692．

Chen FQ，Zhang LP，Lu B，2003．Primary ecological restoration at wastelands of Geheyan Hydroelectrical Project．*Journal of China Three Gorges University*（*Natural Science Edition*），25(2)：180－184．[陈芳清，张丽萍，卢斌，2003．隔河岩水电站废弃地植被的初始生态恢复．三峡大学学报(自然科学版)，25(2)：180－184]

Cong PZ，Li SY，2002．Natural Organic Mass Spectrometry．Beijing：China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Press．698－700．[丛蒲珠，李笋玉，2002．天然有机质谱学．北京：中国医药科技出版社．698－700]

Crombie L，Kilbee GW，Whiting DA，1975．Carbon-13 nuclear mangetic resonance spectra of natural rotenoids and their relatives．*J．Chem．Soc．Perkin Trans．*，1：1 497－1 499．

Deng YC，Xu HH，2005．Studies on insecticidal activities and active ingredients of *Stephan kwangsiensis* Lo．*Scientia Agricultura Sinica*，38(3)：523－527．[邓业成，徐汉虹，2005．广西地不容的杀虫活性及有效成分研究．中国农业科学，38(3)：523－527]

Jiang N，Miu JH，Xie BL，2006．The insectivities of crude extracts from 6 medicine plants against the larvae of *Yponomeuta evonymellus* L．*Chinese Agricultural Science Bulletin*，22(10)：297－299．[蒋妮，缪剑华，谢保令，2006．商陆等 6 种药用植物粗提物对扶芳藤稠李巢蛾的杀虫活性．中国农学通报，22(10)：297－299]

Li XY，Zhang L，Cao W，2004．Investigation of the nodulation and nitrogen-fixing resource of legume in Guizhou Province．*Journal of Southwest China Normal University*（*Natural Science Edition*），29(3)：445－450．[李先源，张磊，曹伟，2004．贵州省豆科结瘤固氮植物资源调查．西南师范大学学报(自然科学版)，29(3)：445－450]

Nunlist R，Ralph J，1988．Rotenone NMR assignments．*Journal of Heterocyclic Chemistry*，25：351－352．

Ognyanov I，Somleva T，1980．Rotenoids and 7，2’，4’，5’-tetramethoxyisoflavone in *Amorpha fruticosa* L．fruits．*Plant Medicine*，38：279－280．

Shi HW，Huang HD，Jiang MX，Jin X，2005．Community characteristics and conservation strategies of *Adiantum reniforme* var．*sinense*，an endemic species in the Three-Gorge Reservoir Region．*Journal of Wuhan Botanical Research*，23(3)：262－266．[史红文，黄汉东，江明喜，金霞，2005．三峡地区特有植物荷叶铁线蕨的群落特征及其保护对策．武汉植物研究，23(3)：262－266]

Tang QY，Feng MG，1997．Practical Statistics and Data Processing System．Beijing：China Agricultural Press．[唐启义，冯明光，1997．实用统计分析及计算机处理平台．北京：中国农业出版社]

Xiao SY，Liu RL，Qian WP，Dai XL，Peng YP，Xie XP，2002．A list of spermatophytes in Pingxiang City．*Jiangxi Forestry Science and Technology*，(3)：20－59．[肖双燕，刘仁林，潜伟萍，戴祥林，彭益萍，谢湘萍，2002．萍乡市种子植物目录．江西林业科技，(3)：20－59]

Xu HH，2001．Insecticidal Plant and Botanical Insecticides．Beijing：China Agricultural Press．[徐汉虹，2001．杀虫植物与植物性杀虫剂．北京：中国农业出版社]

Xu HH，Zhang ZX，Zha YG，2003．The prospect of botanical pesticides in China．*Pesticides*，42(3)：1－10．[徐汉虹，张志祥，查友贵，2003．中国植物性农药开发前景．农药，42(3)：1－10]

Yu XL，Xiao YT，1999．Primary study of limestone endemic plants in Hunan Province．*Journal of Central South Forestry University*，19(2)：34－37．[喻勋林，肖育檀，1999．湖南石灰岩特有植物的初步研究．中

南林学院学报, 19(2):34 - 37]

Yu XL, Xue SG, 1999. Study of the flora of Hunan Dupangling Nature Reserve. *Journal of Central South Forestry University*, 19(1):29 - 34. [喻勋林,薛生国,1999. 湖南都庞岭自然保护区植物区系的研究. 中南林学院学报, 19(1):29 - 34]

Zhang TL, Huang M, He SZ, 2005. Research on resources of the medicinal plant of Cruciferae and Leguminosae in Guizhou. *Guizhou Science*, 23(4):13 - 17. [张天伦,黄敏,何顺志,2005. 贵州十字花科、豆科药用植物资源的研究. 贵州科学, 23(4):13 - 17]

Zhou LJ, Hang JG, Xu HH, Wu RH, 2006. Insecticidal activities of two active components from a Chinese indigenous plant, *Sinacalia tangutica* (Maxim.) B. Nord. against *Musca domestica vicina* Macquart adults. *Acta Entomol. Sin.*, 49(1):74 - 79. [周利娟,黄继光,徐汉虹,吴仁海,2006. 从华蟹甲草中分离的两种活性成分对家蝇的杀虫活性. 昆虫学报, 49(1):74 - 79]

(责任编辑:黄玲巧)